

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-217761

(43)Date of publication of application : 09.08.1994

(51)Int.Cl. C12N 1/20
A23L 1/28
A23L 1/308
A61K 31/715
C12N 1/22
// (C12N 1/20
C12R 1:01)

(21)Application number : 04-182887

(71)Applicant : NISSHIN FLOUR MILLING CO LTD

(22)Date of filing : 18.06.1992

(72)Inventor : YAMADA HIDEAKI

SHIIBA KIWAMU

HARA HIROYOSHI

MORISHITA YOSHIYUKI

(54) GROWTH PROMOTER FOR ENTERAL USEFUL BACTERIA

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a growth promoter containing a water-soluble arabinoxylan as the active component and suitable for promoting growth of *Lactobacillus bifidus* living in the adult intestine.

CONSTITUTION: A water-soluble arabinoxylan, especially a water-soluble arabinoxylan obtained from the arabinoxylan-containing part of a gramineous plant is contained as the active component. This promoter is selectively taken in by a *Lactobacillus bifidus* or a *Lactobacillus* and a *Lactobacillus bifidus* or a *Lactobacillus* can be selectively grown.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.12.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3347163

[Date of registration] 06.09.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-217761

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
A 2 3 L 1/28				
1/308				
A 6 1 K 31/715	A C R	8314-4C		
C 1 2 N 1/22		7236-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-182887
(22)出願日 平成4年(1992)6月18日

(71)出願人 000226998
日清製粉株式会社
東京都中央区日本橋小網町19番12号
(72)発明者 山田 英明
埼玉県上福岡市上ノ原2丁目2番地5 サ
ンハイツ205号
(72)発明者 椎葉 究
埼玉県川越市下新河岸78番地6
(72)発明者 原 博嘉
埼玉県富士見市東みずほ台2丁目10番地29
(72)発明者 森下 芳行
東京都八王子市北野台4-36-6
(74)代理人 弁理士 辻 良子

(54)【発明の名称】 腸内有用菌増殖促進剤

(57)【要約】

【構成】 水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させて得た分子量1500～7000の水溶性アラビノキシランを有効成分とするビフィズス菌増殖促進剤。

【効果】 本発明で用いる水溶性アラビノキシランは、ヒトや動物の腸内細菌のうちで、有用菌であるビフィズス菌や乳酸菌によって選択的に資化されるが、大腸菌等の腐敗菌や他の有害菌によっては資化されないのが、有用菌であるビフィズス菌と乳酸菌のみを選択的に増殖させることができ、ヒトや動物の健康増進に極めて有効であり、特に成人の腸内に生息するビフィズス菌の増殖促進に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤。

【請求項2】 水溶性アラビノキシランの分子量が1500～7000である請求項1の腸内有用菌増殖促進剤。

【請求項3】 イネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させることにより得られた水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は腸内有用菌増殖促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ビフィズス菌や乳酸菌はヒトの腸内に生息し、腸内のpHを酸性に維持して大腸菌等の腐敗菌や病原菌が腸内で生息したり増殖するのを抑制して、ヒトの健康状態を向上させる有用菌であることが広く知られている。そして、このビフィズス菌や乳酸菌は、乳児期では腸内における優勢菌であるが、ヒトの成長につれて大腸菌等の腐敗菌が優勢になり、この腐敗菌が体内に多量の有害物質を生成して人体に悪影響を及ぼすとされている。そこで、ビフィズス菌や乳酸菌を外部から摂取して体内でビフィズス菌や乳酸菌を増殖させることを目的として、ビフィズス菌入りの飲食物が種々開発され販売されている。しかしながら、体外から摂取したビフィズス菌や乳酸菌は、腸内で元々生息し増殖したものではないために、その定着性があまり良好でなく摂取した菌量の割には効果が少ない。

【0003】このために、体内に元々生息するビフィズス菌や乳酸菌をそのまま体内で積極的に増殖させることができる物質に関する研究、開発が近年盛んに行われるようになっており、例えばフラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖等の特定のオリゴ糖にはビフィズス菌増殖促進作用のあることが報告されている。しかしながら、フラクトオリゴ糖や大豆オリゴ糖などは、ビフィズス菌や乳酸菌等の有用菌により分解消化されるだけでなく、バクテロイデス (*Bacteroides*) 菌、ユウバクテリウム (*Eubacterium*) 菌、ミツオケラ (*Mitsuokella*) 菌、大腸菌等の有害菌、なかでも有害菌の代表であるバクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) 菌やバクテロイデス・ブルガタス (*Bacteroides vulgatus*) 菌によっても分解消化されるために、ビフィズス菌等の有用菌のみを選択的に増殖させることができないという欠点を有する。

【0004】また、米糠、小麦フスマなどの穀物の副産物をn-ヘキサン等の有機溶媒で脱脂処理した後、水酸化ナトリウム溶液を加えて窒素ガスで置換した容器内で

抽出して得られる水溶性ヘミセルロース (B) のような多糖類を、ビフィズス菌の腸内における増殖を促進するための整腸剤として用いてことも提案されている (特開昭63-165325号公報)。しかし、本発明者らがこの水溶性ヘミセルロース (B) を用いて追試を行ったところ、水溶性ヘミセルロース (B) のビフィズス菌や乳酸菌の増殖作用は充分満足のゆくものではなかった。特に、乳児の腸内のビフィズス菌の大半がビフィドバクテリウム ブレベ (*B. breve*) やビフィドバクテリウム インファンティス (*B. infantis*) であるのに対して、成人の腸内におけるビフィズス菌の大半はビフィドバクテリウム アド레스センテス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) であり、乳児と成人とでは腸内に生息するビフィズス菌の種類が異なっているが、水溶性ヘミセルロース (B) は、成人の腸内の主たるビフィズス菌である上記のビフィドバクテリウム アド레스センテス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) の増殖作用を有しておらず、整腸が必要な成人には適していないことが判明した。

【0005】

【発明の内容】上記の点から、本発明者らは、ビフィズス菌等の有用菌のみによって選択的に分解消化 (すなわち資化) されて該有用菌のみを増殖させることができ、他の有害菌を増殖させず、特に成人の腸内に生息するビフィズス菌の増殖により適している物質を得ることを目的として研究を行ってきた。その結果、水溶性アラビノキシラン、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を特定の方法で処理して得た水溶性アラビノキシランが、ビフィズス菌や乳酸菌により選択的に資化されてビフィズス菌および乳酸菌を選択的に増殖させることができ、ビフィズス菌のうちでも特に上記したビフィドバクテリウム アド레스センテス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) の増殖に有効であることを見出して本発明を完成した。

【0006】したがって、本発明は、水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤であり、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させることにより得られた水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤である。

【0007】本発明の腸内有用菌増殖促進剤では、小麦フスマなどのイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理し、次いで植物細胞壁崩壊酵素を作用させて得られた水溶性アラビノキシランを使用すると特に優れた腸内有用菌増殖促進作用を示し、この水溶性アラビノキシランは通常約1500～7000の分子量を有している。

【0008】上記の水溶性アラビノキシランは、好ましくは米、小麦、大麦、エン麦、ヒエ、アワ、トウモロコシ、タケ等のイネ科植物の種実の皮部、種実の外皮部、穂軸部、茎部、葉部等、より具体的には種実の皮部であるフスマ、ヌカ、グルテンフィード；種実の外皮であるモミガラ；コーンコブ等の穂軸部；イナワラ、ムギワラ等の茎部等のイネ科植物のアラビノキシラン含有部位から、好ましくは水洗などによって蛋白質等の夾雑物を除去した後に、該アラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で短時間加熱処理して植物細胞壁を少なくとも部分的に破壊するかまたは細胞壁構造をゆるやかにし、次いで植物細胞壁崩壊酵素を作用させて水溶性のアラビノキシランを未分解の細胞壁成分や水不溶性の繊維質部分から水溶性区分として分離・回収することにより得られる。

【0009】その際の植物細胞壁崩壊酵素としては、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ等を挙げることができ、これらが複数混合されている複合酵素を用いるのが好ましい。これらの酵素は高等植物、菌類、細菌などに広く分布しているが、近年微生物に起源を有するものが市販されて入手可能となっており、市販の複合酵素の例としては、上記した“セルラーゼオノズカ”“ペクトリアーゼ Y-23”および“メイセラゼ”、その他にも“フンセラゼ”（ヤクルト社製）、“マセロザイム”（ヤクルト社製）、“セルラーゼ”（シグマ社製）、“ノボザイム”（ノボ社製）などを挙げることができる。

【0010】酵素は、遊離の状態で使用しても担体に固定化して使用してもよい。また、酵素処理は連続法で行ってもバッチ法で行ってもよい。酵素の種類や起源、酵素の使用量、処理時の温度や圧力、pH、処理時間等の諸条件を各々の状況に応じて適宜選んで処理を行うとよい。

【0011】上記の工程を経ることによって、アラビノキシランを組成式 X_nA_m （式中、Xはキシロース単位、Aはアラビノース単位、nはキシロースの結合数、mはアラビノースの結合数を示し、 $n \geq 1$ 、 $m \geq 1$ ）で表わしたときに、重合度（ $m+n$ ）が100以下、特に $m+n$ が11～50のアラビノキシラン、すなわち分子量が1500～7000のアラビノキシランを高い割合で含み（通常50%以上）、更に他の種々の糖を含有する糖混合物の液が得られる。この糖混合物の液は、液状のまま又は乾燥固体にしてそのまま腸内有用菌増殖促進剤として使用しても、または該糖混合物の液を限外濾過膜、活性炭、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換樹脂等の分離手段の1つまたは複数を組合せて処理して、水溶性アラビノキシランを分離回収し、それを腸内有用菌増殖促進剤として使用してもよい。

【0012】本発明で使用する水溶性アラビノキシランの具体的な調製方法は、例えば本出願人の出願に係る特

願平3-282400号に詳細に記載されているが、勿論そこに記載されている方法で得られるものに限定されず、他の方法によっても得ることができる。そして、水溶性アラビノキシランのうちで、特に上記の組成式において $n+m$ が11～50（すなわち分子量が1500～6000）の範囲のアラビノキシランが望ましい。

【0013】本発明の腸内有用菌増殖促進剤では、上記の方法により調製した1種類の水溶性アラビノキシランのみを使用しても、または同様に調製した複数種の水溶性アラビノキシランの混合物を使用してもよい。また、場合により少量の他の糖類を含有していてもよい。本発明で使用する水溶性アラビノキシランは、吸湿性の高い、水溶性の白色固体であり、人間の体内にある酵素では分解されない。

【0014】本発明で使用する水溶性アラビノキシランは、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の細菌、特に成人の腸内における主たるビフィズス菌であるビフィドバクテリウム アドレセンティス (*B. adolescentis*) 菌およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) 菌、並びにラクトバシルス (*Lactobacillus*) 族の細菌によって選択的に資化されて、ビフィズス菌および乳酸菌を増殖するが、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属細菌 [例えばバクテロイデス フラギリス (*B. fragilis*)、バクテロイデス テタオタオミクロン (*B. thetaiotaomicron*)、バクテロイデス ブルガタス (*B. vulgatus*)、バクテロイデス ディスタソミス (*B. distasonis*)、ミツオケラ (*Mitsuokella*) 属細菌 [例えばミツオケラ マルティアシダス (*M. multiacidus*)]、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌 [例えばクロストリジウム ラモーザム (*C. ramosum*)、クロストリジウム パーフリンゲンス (*C. perfringens*)]、ユウバクテリウム (*Eubacterium*) 属細菌 [例えばユウバクテリウム アエロファッセンス (*E. aerofaciens*)、ユウバクテリウム リモーザム (*E. limosum*)]、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*) 属細菌 [例えばペプトストレプトコッカス アナエロビウス (*P. anaerobius*)、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属細菌 [例えばエンテロコッカス フェカリス (*E. faecalis*)、エシェリッヒア (*Escherichia*) 属細菌 [例えばエシェリッヒア コリ (*E. coli*)] 等の他の腸内細菌によっては資化されずそれらの増殖を招かない。

【0015】したがって、本発明の腸内有用菌増殖促進剤をヒトや動物に給与した場合には、有用腸内細菌であるビフィズス菌や乳酸菌によって選択的に資化されてビフィズス菌や乳酸菌を増殖させるが他の有害な腸内細菌や病原菌を増殖させないので、腸内のpHを酸性側に保つことができ、その健康増進を図ることができる。

【0016】本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、粉末状のまま直接ヒトや動物に給与しても、または種々の食物に添加して使用してもよい。更に、本発明の腸内有用

菌増殖促進剤は、錠剤、顆粒剤、丸薬、液剤等の任意形態の薬剤として使用することができる。また、本発明の腸内有用菌増殖促進剤とビフィズス菌および／または乳酸菌とを予め組み合わせたものを調製し、それをヒトや動物に給与すると、ヒトや動物の腸内におけるビフィズス菌や乳酸菌の増殖を一層促進することができ好ましい。本発明の腸内有用菌増殖促進剤とビフィズス菌および／または乳酸菌とを併用する場合は、ビフィズス属の菌のうち、その資化能力のより高い上記したビフィドバクテリウム アドレセンスティス (*B. adolescentis*) 菌およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) 菌を用いるのがよく、それらの菌は乾燥菌体のかたちで用いるのが取り扱い易く便利である。

【0017】また、ビフィズス菌や乳酸菌の生育や増殖には、糖の他にアミノ酸やパントテン酸やリボフラビン等のビタミン類が必要であることが知られており、したがって、そのようなアミノ酸やビタミン類を本発明の腸内有用菌増殖促進剤に配合してヒトや動物に給与すると腸内有用菌の増殖に一層効果がある。本発明の腸内有用菌増殖促進剤を給与するに当たっては、給与対象の種類、年齢、健康状態等に応じてその給与量を適宜選択するとよい。また、本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、ヒトや動物に給与するだけでなく、ビフィズス菌や乳酸菌を実験室や工場等で生産する場合にも栄養源として使用することができる。

【0018】

【実施例】以下に、本発明を例を挙げて具体的に説明するが本発明はそれらによって限定されない。下記の実施例中の％はすべて重量％による。

【0019】《実施例 1》精選小麦フスマ4kgを水洗し、澱粉質や水溶性蛋白質を除去した。この水洗小麦フスマ(水分60%)5kgに水10リットルを加えて十分に混合した後、オートクレーブにて120℃、2.1気圧で10分間加熱処理した。この液の温度50℃にした後、植物細胞壁分解酵素(“セルラーゼオノズカRS”; ヤクルト社製)を10g(キシナラーゼとして83,000units)加えて、50℃で10分間反応させた。反応後、直ちに煮沸して酵素を失活させ、遠心分離(10,000G)を10分間行なった後、上清液を凍結乾燥して凍結乾燥物632g(精選小麦フスマに対する収率=15.8%)を得た。

【0020】この凍結乾燥物中の水溶性アラビノキシラン含有率を、TARIO, BHATTらの方法[Biochem. Biophys. Acta. 222(1970), p339-347]により測定したところ66.7%であった。また、凍結乾燥物の5%水溶液を調製して、下記の条件下にHPLC分析法により分子量分布を調べたところ、図1に示すとおり大部分が5000以下であった。

【0021】HPLC分析条件

注入量:20マイクロリットル

カラム:ウルトラハイドロゲル250(Ultrahydrogel 250)×2本(ウオーターズ社)

溶離液:純水

流速:0.8ミリリットル/分

温度:70℃

検出装置:示差屈折計

【0022】更に、凍結乾燥物を2規定のトリフルオロ酢酸により100℃で2時間加水分解してその構成糖を調べたところ、キシロース:アラビノースの比率は1:0.32であった。上記で得た凍結乾燥物を使用して、下記の方法によって腸内細菌資化判定試験を行った。その結果を下記の表1に示す。

【0023】腸内細菌資化判定試験

ペプトン・イースト・フィルディス (Pepton-Yeast-Fildes: P Y F) 培地に、上記で得た凍結乾燥物を0.5%になるように加えて、これをオートクレーブで115℃で20分間滅菌処理して、糖分解用培地を複数個調製した。次に、イガース・ガグノン (Eggerth-Gagnon; E G) 寒天培地を複数個用意して、その各々に下記の表2に示した菌の各々を発育させてコロニーを形成し、各菌のコロニーを各イガース・ガグノン・フィルディス (Eggerth-Gagnon-Fildes; E G F) 培地に別々に接種して、37℃で1~2日スチールウール法を用いてステンレスジャー中で嫌気培養した。発育した菌液を新たなE G F培地に接種して嫌氣的に1日培養したものを接種材料とした。次いで、各糖分解用培地に各菌液を別々に接種後、7日間嫌気培養を行った後に各培地のpHを測定して、菌液を接種していない対照とのpHの差によって糖の利用状態を判定した。判定基準は以下のとおりである。

【0024】判定基準

— . . . pHの差が0.5未満
W . . . pHの差が0.5~1.0
+ . . . pHの差が1.0~1.5
++ . . . pHの差が1.5より大

【0025】また、比較のため、精製大豆オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ポリデキストロースおよび上記の特開昭63-165325号公報に記載されている水溶性ヘミセルロース(B)を用いて、上記と同様にして腸内細菌資化判定試験を行った。その結果を表1に示す。ここで、フラクトオリゴ糖としては明治製菓株式会社製のメイオリゴP(純度95%以上)を、ポリデキストロースとしてはファイザー株式会社製のポリデキストロースを使用し、また精製大豆オリゴ糖および水溶性ヘミセルロース(B)としては、以下により調製したものを使用した。

【0026】精製大豆オリゴ糖の調製

カルピス食品工業株式会社製の大豆オリゴ糖30gを200ミリリットルの純水に溶かした後、1ミリリットル/分の流速で活性炭カラム(直径2.64cm、長さ4

5 cm; カルボン粒状活性炭; 三井製薬株式会社製) に吸着させた。次いで、10容量%エタノールを5ミリリットル/分の流速で流して、単糖類および2糖類を溶出させた。次に、残りのオリゴ糖を70容量%エタノールを用いて5ミリリットル/分の流速で溶出させた。この第2の溶出液をエバポレーターで濃縮乾固した後、少量の水を加え凍結乾燥して精製大豆オリゴ糖を得た。この精製大豆オリゴ糖の糖組成をHPLC分析により調べたところ、ラフィノースとスタキオースからなっていた。

【0027】水溶性ヘミセルロース(B)の調整
脱脂した小麦フスマ100gに0.5規定の水酸化ナト*

* リウム溶液1リットルを加え、窒素ガスで置換した容器内で130ストローク/分で18時間抽出した。この抽出液を遠心分離処理して(3000rpm、10分間)残渣を除去し、酢酸で中和した後、最終濃度7%になるようにトリクロロ酢酸を加えて蛋白質を除いた上清を得た。次に、限外濾過で脱塩し、上清の約4倍量のメタノールを加えて水溶性多糖の沈殿を得た。この沈殿物を水で溶解した後、凍結乾燥してヘミセルロース(B)の粉末6gを得た。

10 【0028】

【表1】

菌 種	JCM又は ATCC番号	資 化 物 質				
		A	B	C	D	E
<u>Bifidobacterium bifidum</u>	(JCM 1254)	—	—	—	—	—
<u>B. infantis</u>	(JCM 1222)	W	++	++	W	—
<u>B. breve</u>	(JCM 1192)	W	++	++	W	—
<u>B. adolescentis</u>	(JCM 7046)	++	++	++	W	—
<u>B. longum</u>	(JCM 1217)	++	++	++	W	—
<u>Lactobacillus acidophilus</u>	(JCM 1132)	+	++	—	W	—
<u>L. salivarius</u>	(JCM 1231)	+	++	++	W	—
<u>Bacteroides fragilis</u>	(ATCC 23745)	—	++	++	—	—
<u>B. thetaiotaomicron</u>	(JCM 5827)	W	+	W	—	—
<u>B. vulgatus</u>	(JCM 5826)	W	++	++	—	—
<u>B. distasomus</u>	(JCM 5825)	W	W	+	—	—
<u>Mitsuokella multiacidus</u>	(JCM 2055)	W	++	++	W	—
<u>Clostridium ramosum</u>	(JCM 1298)	—	+	—	W	—
<u>C. perfringens</u>	(JCM 1290)	—	W	W	—	—
<u>Eubacterium aerofaciens</u>	(ATCC 25986)	W	++	—	—	—
<u>E. limosum</u>	(JCM 6421)	—	—	—	—	—
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	(ATCC 27337)	—	—	—	—	—
<u>Enterococcus faecalis</u>	(JCM 5803)	—	—	—	—	—
<u>Escherichia coli</u>	(JCM 1649)	—	—	—	—	—

A: 実施例1の水溶性アラビノキシラン、 B: フラクトオリゴ糖、
C: 精製大豆オリゴ糖、 D: ポリデキストロース
E: 特開昭63-165325号のヘミセルロース(B)

【0029】上記表1の結果から、本発明の水溶性アラビノキシランはビフィズス菌および乳酸菌、そのうちでも特に成人の腸内に生息するビフィズス菌の大半を占めるビフィドバクテリウム アドレセンス (B. adole-

centis) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) によって選択的に資化されてそれらの菌を増殖させ、そして他の細菌によっては資化されないかまたは僅かしか資化されず他の細菌を増殖させないことがわかる。それに対して、フラクトオリゴ糖および精製大豆オリゴ糖はビフィズス菌や乳酸菌によって資化されるものの他の細菌によっても同様に資化されビフィズス菌および乳酸菌のみを選択的に増殖させることができないこと、またポリデキストロースはビフィズス菌によって僅かしか資化されずビフィズス菌の増殖促進作用が極めて*10

*低いこと、更に水溶性ヘミセルロース (B) はビフィズス菌、乳酸菌および他の細菌のいずれによっても資化されずビフィズス菌および乳酸菌の増殖促進作用をほとんど有していないことがわかる。

【0030】《実施例 2》[動物実験]

下記の表2に示す組成を有する3種類の飼料を準備した。

【0031】

【表2】

	飼料1 (重量%)	飼料2 (重量%)	飼料3 (重量%)
カゼイン	23.0	23.0	23.0
コーンスターチ	61.7	59.2	56.7
コーンオイル	5.0	5.0	5.0
水溶性アラビノキシラン	—	2.5	5.0
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3
ビタミン	1.0	1.0	1.0
ミネラル	4.0	4.0	4.0
セルロース	5.0	5.0	5.0
合 計	100.0	100.0	100.0

【0032】3週齢のウイスターラットを5匹を1群として3群用意し、各群に表2に示した飼料の各々を4週間連続して食餌した。更にICRマウスを5匹を1群として3群用意し、各群に表2に示した飼料の各々を4週間連続して食餌した。4週間後にそれらの盲腸内容物を採取し、希釈液[リン酸バッファー (pH 7.2) に寒

天を0.1%になるように加えたもの]を用いて希釈した後、下記の表3に示す培地および培養条件で、表3に示す各種の腸内細菌を培養してその数を測定して、5匹の平均値を採った。

【0033】

【表3】

培地名	微生物名	培養条件
DHL寒天培地	<u>Esherichia coli</u>	好気 37℃ 1日
TATAC寒天培地	<u>Streptococcus</u>	好気 37℃ 2日
同 上	<u>Enterococcus</u>	同 上
同 上	<u>Staphylococcus</u>	同 上
Trypticase soy 血液寒天培地	好気性細菌	好気 37℃ 1日
BS寒天培地	<u>Bifidobacterium</u>	嫌気 ¹⁾ 37℃ 3日
NBGT寒天培地	<u>Bacteroidaceae</u>	嫌気 ¹⁾ 37℃ 3日
LBS寒天培地	<u>Lactobacillus</u>	嫌気 ¹⁾ 37℃ 2日
Neomycin Nagler寒天培地	<u>Clostridium</u>	嫌気 ¹⁾ 37℃ 3日
BL寒天培地	嫌気性細菌	嫌気 ¹⁾ 37℃ 3日
EG寒天培地	嫌気性細菌	嫌気 ¹⁾ 37℃ 3日

1) スチールジャーを使用して、スチールウール法で90%N₂+10%CO₂置換の条件で培養

【0034】また、盲腸内容物を純水で希釈した後、下記の条件下にガスクロマトグラフィー分析を行って、各種揮発性脂肪酸量を測定して5匹の平均値を採った。それと併せてpHの測定を行って5匹の平均値を採った。

【0035】ガスクロマトグラフィー分析条件
検出器:水素炎検出器 (Flame ionization detector) (FID)

カラム:Unisole F-200 (直径3mm、長さ2m)

温度:146℃

その結果、ウイスターラットでは下記の表4に示す結果を得た。

【0036】

【表4】

	第1群	第2群	第3群
給餌飼料	飼料1	飼料2	飼料3
(水溶性アラビノキラン)	(0%)	(2.5%)	(5%)
腸内細菌数(Log細菌数/g)			
<u>Escherichia coli</u>	6.3±0.4 ^a	6.7±0.1 ^a	5.0±0.5 ^{a,d}
<u>Streptococcus</u>	6.8±0.4 ^a	6.8±0.2 ^a	5.9±0.7 ^a
<u>Enterococcus</u>	5.8±0.7	6.0±1.0	5.6±0.8
<u>Staphylococcus</u>	4.6±0.5	4.5±0.3	3.7±1.1
<u>Lactobacillus</u>	7.7±0.5	8.1±1.2	7.9±0.9
<u>Bifidobacterium</u>	7.3±0.6 ^{a,d}	8.7±1.2 ^a	9.7±0.4 ^a
<u>Bacteroidaceae</u>	9.8±0.1	9.8±0.2	9.8±0.1
<u>An. G(+) coccus¹⁾</u>	8.3(3) ²⁾	8.8(1)	8.8(1)
<u>Clostridium</u>	8.7±0.2(4)	8.9±0.4(5)	8.8±0.7(2)

揮発性脂肪酸量(μmol/g)

酢酸	46.7±4.5 ^{b,d}	62.7±11.3 ^b	74.5±8.8 ^a
プロピオン酸	12.2±1.2 ^a	18.9±2.7 ^a	20.2±1.4 ^a
イソブチル酸	0.8±0.1 ^a	0.6±0.2 ^b	0.3±0.1 ^{b,d}
ブチル酸	9.7±2.0 ^a	9.6±2.2 ^b	7.0±1.4 ^a
イソバレイン酸	0.6±0.1 ^b	0.6±0.2	0.4±0.1 ^b
バレイン酸	1.0±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1
合計	70.9±7.1 ^{c,d}	93.2±12.9 ^c	103.3±9.4 ^d

1) 嫌気性グラム陽性のコッカス(ペプトストレプトコッカス等を含む)

2) 陽性例

a: 0.05, b: 0.02, c: 0.01, d: 0.001レベルで同じ符号間に有意差あり

【0037】また、ICRマウスでは下記の表5に示す結果を得た。

【0038】
【表5】

	第1群	第2群	第3群
給餌飼料 (水溶性アラビノキラン)	飼料1 (0%)	飼料2 (2.5%)	飼料3 (5%)
腸内細菌数(Log細菌数/g)			
<i>Escherichia coli</i>	5.4±0.7 ^a	5.0±0.3	4.6±0.3 ^a
<i>Streptococcus</i>	5.3±1.1 ^d	4.4±0.3 ^d	0 ^d
<i>Enterococcus</i>	5.4±0.8	5.5±0.8	5.5±0.5
<i>Staphylococcus</i>	4.2±0.7	3.5±2.1	3.4±1.9
<i>Lactobacillus</i>	8.0±0.7	8.7±0.5	8.4±0.6
<i>Bifidobacterium</i>	9.1±0.2 ^{a,d}	9.7±0.5 ^a	10.0±0.2 ^d
<i>Bacteroidaceae</i>	9.4±0.4	9.5±0.3	9.4±0.2
<i>An. G(+)</i> coccus ¹⁾	9.5±0.5	9.5±0.3	9.6±0.3
揮発性脂肪酸量(μmol/g)			
酢酸	25.7±1.4 ^d	33.1±7.2 ^c	51.3±8.6 ^{c,d}
プロピオン酸	5.5±1.3 ^c	7.4±2.1	10.1±2.2 ^c
イソ酪酸	0.7±0.1 ^{c,d}	0.4±0.1 ^c	0.3±0.1 ^d
酪酸	4.8±1.0 ^d	7.3±3.4	16.3±5.2 ^d
イソ吉草酸	0.7±0.1 ^{b,d}	0.5±0.2 ^b	0.4±0.1 ^d
吉草酸	0.7±0.1	0.6±0.2	0.8±0.2
合計	38.2±3.3 ^d	49.3±10.9 ^c	78.9±12.5 ^{c,d}
pH	7.7±0.2 ^d	7.5±0.2 ^c	7.1±0.2 ^{c,d}

1) 嫌気性グラム陽性のコッカス(ペプトストレプトコッカス等を含む)

2) 陽性例

a : 0.05, b : 0.02, c : 0.01, d : 0.001レベルで同じ符号間に有意差あり

【0039】表4の結果から、ウイスターラットを用いた実験では、本発明における特定の水溶性アラビノキシランを含有する飼料2および飼料3を給餌した第2群と第3群では、該水溶性アラビノキシランを含まない飼料1と給餌した第1群のラットに比べて、水溶性アラビノキシランの添加量の応じて有用菌であるビフィズス菌が有意に増加し、一方有害菌である大腸菌、ストレプトコッカス菌およびスタフィロコッカス菌は第2群では増加せず変化がなく、第3群では有意に減少していることがわかる。また、表4の結果から、水溶性アラビノキシランの添加量に応じて、酢酸およびプロピオン酸の量が顕著に増加すると共にpHが低下することがわかる。

【0040】更に表5の結果から、ICRマウスを用いた実験においても、ウイスターラットによる実験の場合とほぼ同じ傾向になることがわかる。

【0041】

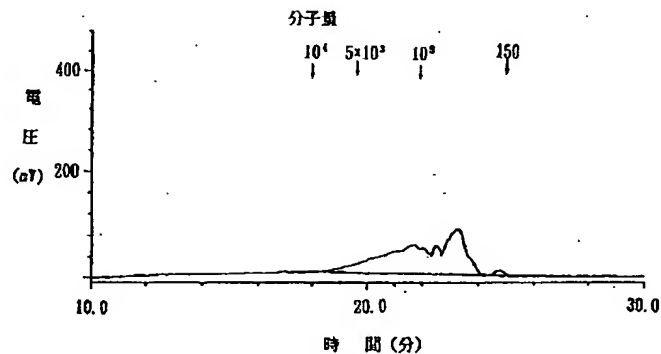
【発明の効果】水溶性アラビノキシラン、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させることにより得られた分子量が1500～7000の水溶性アラビノキシランを有効成分とする本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、ヒトや動物の腸内細菌のうち、有用菌であるビフィズス菌および乳酸菌によって選択的に資化され大腸菌等の腐敗菌や他の有害菌によっては資化されないで、有害菌の増殖を招かず、有用菌であるビフィズス菌や乳酸菌を選択的に増殖させることができ、ヒトや動物の健康を増進させることができる。特に、本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、成人の腸内におけるビフィズス菌の大半を占めるビフィドバクテリウム アドレセンステス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) の増殖促進効果が大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の水溶性アラビノキシランのHPLC*

* 分析により得られた各フラクションのクロマトグラムを示す図である。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成4年10月9日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は腸内有用菌増殖促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ビフィズス菌や乳酸菌はヒトの腸内に生息し、腸内のpHを酸性に維持して大腸菌等の腐敗菌や病原菌が腸内で生息したり増殖するのを抑制して、ヒトの健康状態を向上させる有用菌であることが広く知られている。そして、このビフィズス菌や乳酸菌は、乳児期では腸内における優勢菌であるが、ヒトの成長につれて大腸菌等の腐敗菌が優勢になり、この腐敗菌が体内に多量の有害物質を生成して人体に悪影響を及ぼすとされている。そこで、ビフィズス菌や乳酸菌を外部から摂取して体内でビフィズス菌や乳酸菌を増殖させることを目的として、ビフィズス菌入りの飲食物が種々開発され販売されている。しかしながら、体外から摂取したビフィズス菌や乳酸菌は、腸内で元々生息し増殖したものではないために、その定着性があまり良好でなく摂取した菌量の割には効果が少ない。

【0003】このために、体内に元々生息するビフィズス菌や乳酸菌をそのまま体内で積極的に増殖させることができる物質に関する研究、開発が近年盛んに行われるようになっており、例えばフラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖等の特定のオリゴ糖にはビフィズス菌増殖促進作用

のあることが報告されている。しかしながら、フラクトオリゴ糖や大豆オリゴ糖などは、ビフィズス菌や乳酸菌等の有用菌により分解消化されるだけでなく、バクテロイデス (*Bacteroides*) 菌、ユウバクテリウム (*Eubacterium*) 菌、ミツオケラ (*Mitsuokella*) 菌、大腸菌等の有害菌、なかでも有害菌の代表であるバクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) 菌やバクテロイデス・ブルガタス (*Bacteroides vulgatus*) 菌によっても分解消化されるために、ビフィズス菌等の有用菌のみを選択的に増殖させることができないという欠点を有する。

【0004】また、米糠、小麦フスマなどの穀物の副産物をn-ヘキサン等の有機溶媒で脱脂処理した後、水酸化ナトリウム溶液を加えて窒素ガスで置換した容器内で抽出して得られる水溶性ヘミセルロース (B) のような多糖類を、ビフィズス菌の腸内における増殖を促進するための整腸剤として用いても提案されている (特開昭63-165325号公報)。しかし、本発明者らがこの水溶性ヘミセルロース (B) を用いて追試を行ったところ、水溶性ヘミセルロース (B) のビフィズス菌や乳酸菌の増殖作用は充分満足のゆくものではなかった。特に、乳児の腸内のビフィズス菌の大半がビフィドバクテリウム プレベ (*B. breve*) やビフィドバクテリウム インファンティス (*B. infantis*) であるのに対して、成人の腸内におけるビフィズス菌の大半はビフィドバクテリウム アド레스センテス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) であり、乳児と成人とでは腸内に生息するビフィズス菌の種類が異なっているが、水溶性ヘミセルロース (B) は、成人の腸内の主たるビフィズス菌である上記のビフィドバクテリウム アド레스センテス (*B. adolescentis*) およびビ

フィドバクテリウムロングム (*B. longum*) の増殖作用を有しておらず、整腸が必要な成人には適していないことが判明した。

【0005】

【発明の内容】上記の点から、本発明者らは、ビフィズス菌等の有用菌のみによって選択的に分解消化（すなわち資化）されて該有用菌のみを増殖させることができ、他の有害菌を増殖させず、特に成人の腸内に生息するビフィズス菌の増殖により適している物質を得ることを目的として研究を行ってきた。その結果、水溶性アラビノキシラン、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を特定の方法で処理して得た水溶性アラビノキシランが、ビフィズス菌や乳酸菌により選択的に資化されてビフィズス菌および乳酸菌を選択的に増殖させることができ、ビフィズス菌のうちでも特に上記したビフィドバクテリウム アドレセンス (*B. adolescentis*) およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) の増殖に有効であることを見出して本発明を完成した。

【0006】したがって、本発明は、水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤であり、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させることにより得られた水溶性アラビノキシランを有効成分とする腸内有用菌増殖促進剤である。

【0007】本発明の腸内有用菌増殖促進剤では、小麦フスマなどのイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理し、次いで植物細胞壁崩壊酵素を作用させて得られた水溶性アラビノキシランを使用すると特に優れた腸内有用菌増殖促進作用を示し、この水溶性アラビノキシランは通常約1500～7000の分子量を有している。

【0008】上記の水溶性アラビノキシランは、好ましくは米、小麦、大麦、エン麦、ヒエ、アワ、トウモロコシ、タケ等のイネ科植物の種実の皮部、種実の外皮部、穂軸部、茎部、葉部等、より具体的には種実の皮部であるフスマ、ヌカ、グルテンフィード；種実の外皮部であるモミガラ；コーンコブ等の穂軸部；イナワラ、ムギワラ等の茎部等のイネ科植物のアラビノキシラン含有部位から、好ましくは水洗などによって蛋白質等の夾雑物を除去した後に、該アラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で短時間加熱処理して植物細胞壁を少なくとも部分的に破壊するかまたは細胞壁構造をゆるやかにし、次いで植物細胞壁崩壊酵素を作用させて水溶性のアラビノキシランを未分解の細胞壁成分や水不溶性の繊維質部分から水溶性区分として分離・回収することにより得られる。

【0009】その際の植物細胞壁崩壊酵素としては、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ等を挙げるこ

とができ、これらが複数混合されている複合酵素を用いるのが好ましい。これらの酵素は高等植物、菌類、細菌などに広く分布しているが、近年微生物に起源を有するものが市販されて入手可能となっており、市販の複合酵素の例としては、上記した“セルラーゼオノズカ”“ペクトリアーゼ Y-23”および“メイセルラーゼ”、その他にも“フンセラージェ”（ヤクルト社製）、“マセロザイム”（ヤクルト社製）、“セルラーゼ”（シグマ社製）、“ノボザイム”（ノボ社製）などを挙げるができる。

【0010】酵素は、遊離の状態で使用しても担体に固定化して使用してもよい。また、酵素処理は連続法で行ってもバッチ法で行ってもよい。酵素の種類や起源、酵素の使用量、処理時の温度や圧力、pH、処理時間等の諸条件を各々の状況に応じて適宜選んで処理を行うとよい。

【0011】上記の工程を経ることによって、アラビノキシランを組成式X_nA_m（式中、Xはキシロース単位、Aはアラビノース単位、nはキシロースの結合数、mはアラビノースの結合数を示し、n≥1、m≥1）で表わしたときに、重合度（m+n）が100以下、特にm+nが11～50のアラビノキシラン、すなわち分子量が1500～7000のアラビノキシランを高い割合で含み（通常50%以上）、更に他の種々の糖を含有する糖混合物の液が得られる。この糖混合物の液は、液状のまま又は乾燥固体にしてそのまま腸内有用菌増殖促進剤として使用しても、または該糖混合物の液を限外濾過膜、活性炭、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換樹脂等の分離手段の1つまたは複数を組合せて処理して、水溶性アラビノキシランを分離回収し、それを腸内有用菌増殖促進剤として使用してもよい。

【0012】本発明で使用する水溶性アラビノキシランの具体的な調製方法は、例えば本出願人の出願に係る特願平3-282400号に詳細に記載されているが、勿論そこに記載されている方法で得られるものに限定されず、他の方法によっても得ることができる。そして、水溶性アラビノキシランのうちで、特に上記の組成式においてn+mが11～50（すなわち分子量が1500～6000）の範囲のアラビノキシランが望ましい。

【0013】本発明の腸内有用菌増殖促進剤では、上記の方法により調製した1種類の水溶性アラビノキシランのみを使用しても、または同様にして調製した複数種の水溶性アラビノキシランの混合物を使用してもよい。また、場合により少量の他の糖類を含有していてもよい。本発明で使用する水溶性アラビノキシランは、吸湿性の高い、水溶性の白色固体であり、人間の体内にある酵素では分解されない。

【0014】本発明で使用する水溶性アラビノキシランは、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の細菌、特に成人の腸内における主たるビフィズス菌である

ビフィドバクテリウム アドレセンティス (*B. adolescentis*) 菌およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) 菌、並びにラクトバシルス (*Lactobacillus*) 族の細菌によって選択的に資化されて、ビフィズス菌および乳酸菌を増殖するが、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属細菌 [例えばバクテロイデス フラギリス (*B. fragilis*)、バクテロイデス テタイオタオミクロン (*B. theta iotaomicron*)、バクテロイデス プルガタス (*B. vulgatus*)、バクテロイデス ディスタソミス (*B. distasomus*)、ミツオケラ (*Mitsuokella*) 属細菌 [例えばミツオケラ マルティアシダス (*M. multiacidus*)]、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌 [例えばクロストリジウム ラモーザム (*C. ramosum*)、クロストリジウム パーフリングス (*C. perfringens*)]、ユウバクテリウム (*Eubacterium*) 属細菌 [例えばユウバクテリウム アエロファッセンス (*E. aerofaciens*)、ユウバクテリウム リモーザム (*E. limosum*)]、ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*) 属細菌 [例えばペプトストレプトコッカス アナエロビウス (*P. anaerobius*)、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属細菌 [例えばエンテロコッカス フェカリス (*E. faecalis*)、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌 [例えばエシェリヒア コリ (*E. coli*)]] 等の他の腸内細菌によっては資化されずそれらの増殖を招かない。

【0015】したがって、本発明の腸内有用菌増殖促進剤をヒトや動物に給与した場合には、有用腸内細菌であるビフィズス菌や乳酸菌によって選択的に資化されてビフィズス菌や乳酸菌を増殖させるが他の有害な腸内細菌や病原菌を増殖させないので、腸内の pH を酸性側に保つことができ、その健康増進を図ることができる。

【0016】本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、粉末状のまま直接ヒトや動物に給与しても、または種々の食物に添加して使用してもよい。更に、本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、錠剤、顆粒剤、丸薬、液剤等の任意形態の薬剤として使用することができる。また、本発明の腸内有用菌増殖促進剤とビフィズス菌および/または乳酸菌とを予め組み合わせたものを調製し、それをヒトや動物に給与すると、ヒトや動物の腸内におけるビフィズス菌や乳酸菌の増殖を一層促進することができ好ましい。本発明の腸内有用菌増殖促進剤とビフィズス菌および/または乳酸菌とを併用する場合は、ビフィズス属の菌のうち、その資化能力のより高い上記したビフィドバクテリウム アドレセンティス (*B. adolescentis*) 菌およびビフィドバクテリウム ロングム (*B. longum*) 菌を用いるのがよく、それらの菌は乾燥菌体のかたちで用いるのが取り扱い易く便利である。

【0017】また、ビフィズス菌や乳酸菌の生育や増殖には、糖の他にアミノ酸やパントテン酸やリボフラビン等のビタミン類が必要であることが知られており、したがって、そのようなアミノ酸やビタミン類を本発明の腸

内有用菌増殖促進剤に配合してヒトや動物に給与すると腸内有用菌の増殖に一層効果がある。本発明の腸内有用菌増殖促進剤を給与するに当たっては、給与対象の種類、年齢、健康状態等に応じてその給与量を適宜選択するとよい。また、本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、ヒトや動物に給与するだけでなく、ビフィズス菌や乳酸菌を実験室や工場等で生産する場合にも栄養源として使用することができる。

【0018】

【実施例】以下に、本発明を例を挙げて具体的に説明するが本発明はそれらによって限定されない。下記の実施例中の%はすべて重量%による。

【0019】《実施例 1》精選小麦フスマ 4 kg を水洗し、澱粉質や水溶性蛋白質を除去した。この水洗小麦フスマ (水分 60%) 5 kg に水 10 リットルを加えて十分に混合した後、オートクレーブにて 120℃、2.1 気圧で 10 分間加熱処理した。この液の温度 50℃にした後、植物細胞壁分解酵素 (「セルラーゼオノズカ RS」; ヤクルト社製) を 10 g (キシナラーゼとして 83,000 units) 加えて、50℃で 10 分間反応させた。反応後、直ちに煮沸して酵素を失活させ、遠心分離 (10,000 G) を 10 分間行った後、上清液を凍結乾燥して凍結乾燥物 632 g (精選小麦フスマに対する収率 = 15.8%) を得た。

【0020】この凍結乾燥物中の水溶性アラビノキシラン含有率を、TARIO, BHATT らの方法 [Biochem. Biophys. Acta. 222(1970), p339-347] により測定したところ 66.7% であった。また、凍結乾燥物の 5% 水溶液を調製して、下記の条件下に HPLC 分析法により分子量分布を調べたところ、図 1 に示すとおり大部分が 5000 以下であった。

【0021】HPLC 分析条件

注入量: 20 マイクロリットル

カラム: ウルトラハイドロゲル 250 (Ultrahydrogel 250) × 2 本 (ウオーターズ社)

溶離液: 純水

流速: 0.8 ミリリットル/分

温度: 70℃

検出装置: 示差屈折計

【0022】更に、凍結乾燥物を 2 規定のトリフルオロ酢酸により 100℃で 2 時間加水分解してその構成糖を調べたところ、キシロース: アラビノースの比率は 1:0.32 であった。上記で得た凍結乾燥物を使用して、下記の方法によって腸内細菌資化判定試験を行った。その結果を下記の表 1 に示す。

【0023】腸内細菌資化判定試験

ペプトン・イースト・フィルディス (Pepton-Yeast-Fildes: P Y F) 培地に、上記で得た凍結乾燥物を 0.5% になるように加えて、これをオートクレーブで 115℃で 20 分間滅菌処理して、糖分解用培地を複数個調

製した。次に、イガース・ガグノン (Eggerth-Gagnon; EG) 寒天培地を複数個用意して、その各々に下記の表2に示した菌の各々を发育させてコロニーを形成し、各菌のコロニーを各イガース・ガグノン・フィルデイス (Eggerth-Gagnon-Fildes; EGF) 培地に別々に接種して、37℃で1～2日スチールウール法を用いてステンレスジャー中で嫌気培養した。发育した菌液を新たなEGF培地に接種して嫌氣的に1日培養したものを接種材料とした。次いで、各糖分解用培地に各菌液を別々に接種後、7日間嫌気培養を行った後に各培地のpHを測定して、菌液を接種していない対照とのpHの差によって糖の利用状態を判定した。判定基準は以下のとおりである。

【0024】判定基準

- …… pHの差が0.5未満
- W …… pHの差が0.5～1.0
- ＋ …… pHの差が1.0～1.5
- ++ …… pHの差が1.5より大

【0025】また、比較のため、精製大豆オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ポリデキストロースおよび上記の特開昭63-165325号公報に記載されている水溶性ヘミセルロース(B)を用いて、上記と同様にして腸内細菌資化判定試験を行った。その結果を表1に示す。ここで、フラクトオリゴ糖としては明治製菓株式会社製のメイオリゴP(純度95%以上)を、ポリデキストロースとしてはファイザー株式会社製のポリデキストロースを使用し、また精製大豆オリゴ糖および水溶性ヘミセルロース(B)としては、以下により調製したものを使用し

た。

【0026】精製大豆オリゴ糖の調製：カルピス食品工業株式会社製の大豆オリゴ糖30gを200ミリリットルの純水に溶かした後、1ミリリットル/分の流速で活性炭カラム(直径2.64cm、長さ45cm；カルボン粒状活性炭；三井製薬株式会社製)に吸着させた。次いで、10容量%エタノールを5ミリリットル/分の流速で流して、単糖類および2糖類を溶出させた。次に、残りのオリゴ糖を70容量%エタノールを用いて5ミリリットル/分の流速で溶出させた。この第2の溶出液をエバポレーターで濃縮乾固した後、少量の水を加え凍結乾燥して精製大豆オリゴ糖を得た。この精製大豆オリゴ糖の糖組成をHPLC分析により調べたところ、ラフィノースとスタキオースからなっていた。

【0027】水溶性ヘミセルロース(B)の調整：脱脂した小麦フスマ100gに0.5規定の水酸化ナトリウム溶液1リットルを加え、窒素ガスで置換した容器内で130ストローク/分で18時間抽出した。この抽出液を遠心分離処理して(3000rpm、10分間)残渣を除去し、酢酸で中和した後、最終濃度7%になるようにトリクロロ酢酸を加えて蛋白質を除いた上清を得た。次に、限外濾過で脱塩し、上清の約4倍量のメタノールを加えて水溶性多糖の沈殿を得た。この沈殿物を水で溶解した後、凍結乾燥してヘミセルロース(B)の粉末6gを得た。

【0028】

【表1】

菌 種	JCM又は ATCC番号	資 化 物 質				
		A	B	C	D	E
<u>Bifidobacterium</u> <u>bifidum</u>	(JCM 1254)	—	—	—	—	—
<u>B.</u> <u>infantis</u>	(JCM 1222)	W	++	++	W	—
<u>B.</u> <u>breve</u>	(JCM 1192)	W	++	++	W	—
<u>B.</u> <u>adolescentis</u>	(JCM 7046)	++	++	++	W	—
<u>B.</u> <u>longum</u>	(JCM 1217)	++	++	++	W	—
<u>Lactobacillus</u> <u>acidophilus</u>	(JCM 1132)	+	++	—	W	—
<u>L.</u> <u>salivarius</u>	(JCM 1231)	+	++	++	W	—
<u>Bacteroides</u> <u>fragilis</u>	(ATCC 23745)	—	++	++	—	—
<u>B.</u> <u>thetaiotaomicron</u>	(JCM 5827)	W	+	W	—	—
<u>B.</u> <u>vulgatus</u>	(JCM 5826)	W	++	++	—	—
<u>B.</u> <u>distasomus</u>	(JCM 5825)	W	W	+	—	—
<u>Mitsuokella</u> <u>multiacidus</u>	(JCM 2055)	W	++	++	W	—
<u>Clostridium</u> <u>ramosum</u>	(JCM 1298)	—	+	—	W	—
<u>C.</u> <u>perfringens</u>	(JCM 1290)	—	W	W	—	—
<u>Eubacterium</u> <u>aerofaciens</u>	(ATCC 25986)	W	++	—	—	—
<u>E.</u> <u>limosum</u>	(JCM 6421)	—	—	—	—	—
<u>Peptostreptococcus</u> <u>anaerobius</u>	(ATCC 27337)	—	—	—	—	—
<u>Enterococcus</u> <u>faecalis</u>	(JCM 5803)	—	—	—	—	—
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	(JCM 1649)	—	—	—	—	—

A:実施例1の水溶性アラビノキシラン、 B:フラクトオリゴ糖、
 C:精製大豆オリゴ糖、 D:ポリデキストロース
 E:特開昭63-165325号のヘミセルロース(B)

【0029】上記表1の結果から、本発明の水溶性アラビノキシランはビフィズス菌および乳酸菌、そのうちでも特に成人の腸内に生息するビフィズス菌の大半を占めるビフィドバクテリウム アドレセンスンテス (B. adolescentis) およびビフィドバクテリウム ロングム (B. longum) によって選択的に資化されてそれらの菌を増殖させ、そして他の細菌によっては資化されないかまたは僅かしか資化されず他の細菌を増殖させないことがわかる。それに対して、フラクトオリゴ糖および精製大豆オリゴ糖はビフィズス菌や乳酸菌によって資化されるものの他の細菌によっても同様に資化されビフィズス菌および乳酸菌のみを選択的に増殖させることができないこと、またポリデキストロースはビフィズス菌によって僅

かしか資化されずビフィズス菌の増殖促進作用が極めて低いこと、更に水溶性ヘミセルロース (B) はビフィズス菌、乳酸菌および他の細菌のいずれによっても資化されずビフィズス菌および乳酸菌の増殖促進作用をほとんど有していないことがわかる。

【0030】《実施例 2》【動物実験】

実施例1で製造した水溶性アラビノキシラン（凍結乾燥物）を使用して下記の表2に示す組成を有する3種類の飼料を準備した。

【0031】

【表2】

	飼料1 (重量%)	飼料2 (重量%)	飼料3 (重量%)
カゼイン	23.0	23.0	23.0
コーンスターチ	61.7	59.2	56.7
コーンオイル	5.0	5.0	5.0
水溶性アラビノキシラン	—	2.5	5.0
D L-メチオニン	0.3	0.3	0.3
ビタミン	1.0	1.0	1.0
ミネラル	4.0	4.0	4.0
セルロース	5.0	5.0	5.0
合 計	100.0	100.0	100.0

【0032】3週齢のウイスターラットを5匹を1群として3群用意し、各群に表2に示した飼料の各々を4週間連続して食餌した。更にICRマウスを5匹を1群として3群用意し、各群に表2に示した飼料の各々を4週間連続して食餌した。4週間後にそれらの盲腸内容物を採取し、希釈液〔リン酸バッファー (pH 7.2) に寒天を0.1%になるように加えたもの〕を用いて希釈し*

* した後、下記の表3に示す培地および培養条件で、表3に示す各種の腸内細菌を培養してその数を測定して、5匹の平均値を採った。

【0033】

【表3】

培地名	微生物名	培養条件
DHL寒天培地	<u>Escherichia coli</u>	好気 37°C 1日
TATAC寒天培地	<u>Streptococcus</u>	好気 37°C 2日
同 上	<u>Enterococcus</u>	同 上
同 上	<u>Staphylococcus</u>	同 上
Trypticase soy 血液寒天培地	好気性細菌	好気 37°C 1日
BS寒天培地	<u>Bifidobacterium</u>	嫌気 ¹⁾ 37°C 3日
NBGT寒天培地	<u>Bacteroides</u>	嫌気 ¹⁾ 37°C 3日
LBS寒天培地	<u>Lactobacillus</u>	嫌気 ¹⁾ 37°C 2日
Neomycin Nagler寒天培地	<u>Clostridium</u>	嫌気 ¹⁾ 37°C 3日
BL寒天培地	嫌気性細菌	嫌気 ¹⁾ 37°C 3日
EG寒天培地	嫌気性細菌	嫌気 ¹⁾ 37°C 3日

1) スチールジャーを使用して、スチールウール法で90%N₂+10%CO₂置換の条件で培養

【0034】また、盲腸内容物を純水で希釈した後、下記の条件下にガスクロマトグラフィー分析を行って、各種揮発性脂肪酸量を測定して5匹の平均値を採った。それと併せてpHの測定を行って5匹の平均値を採った。

【0035】ガスクロマトグラフィー分析条件
検出器:水素炎検出器 (Flame ionization detector) (FID)

カラム:Unisole F-200 (直径3mm、長さ2m)
温 度:146°C

その結果、ウイスターラットでは下記の表4に示す結果を得た。

【0036】

【表4】

	第1群	第2群	第3群
給餌飼料 (水溶性アラビノキラン)	飼料1 (0%)	飼料2 (2.5%)	飼料3 (5%)
腸内細菌数(Log細菌数/g)			
<u>Esherichia coli</u>	6.3±0.4 ^c	6.7±0.1 ^d	5.0±0.5 ^{c,d}
<u>Streptococcus</u>	6.8±0.4 ^a	6.8±0.2 ^a	5.9±0.7 ^a
<u>Enterococcus</u>	5.8±0.7	6.0±1.0	5.6±0.8
<u>Staphylococcus</u>	4.6±0.5	4.5±0.3	3.7±1.1
<u>Lactobacillus</u>	7.7±0.5	8.1±1.2	7.9±0.9
<u>Bifidobacterium</u>	7.3±0.6 ^{a,d}	8.7±1.2 ^a	9.7±0.4 ^d
<u>Bacteroidaceae</u>	9.8±0.1	9.8±0.2	9.8±0.1
<u>An. G(+) coccus¹⁾</u>	8.3(3) ²⁾	8.8(1)	8.8(1)
<u>Clostridium</u>	8.7±0.2(4)	8.9±0.4(5)	8.8±0.7(2)
揮発性脂肪酸量(μmol/g)			
酢酸	46.7±4.5 ^{b,d}	62.7±11.3 ^b	74.5±8.8 ^d
プロピオン酸	12.2±1.2 ^d	18.9±2.7 ^d	20.2±1.4 ^d
イソブチル酸	0.8±0.1 ^d	0.6±0.2 ^b	0.3±0.1 ^{b,d}
ブチル酸	9.7±2.0 ^a	9.6±2.2 ^b	7.0±1.4 ^a
イソバレイン酸	0.6±0.1 ^b	0.6±0.2	0.4±0.1 ^b
バレイン酸	1.0±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1
合計	70.9±7.1 ^{c,d}	93.2±12.9 ^c	103.3±9.4 ^d

1) 嫌気性グラム陽性のコッカス(ペプトストレプトコッカス等を含む)

2) 陽性例

a: 0.05, b: 0.02, c: 0.01, d: 0.001レベルで同じ符号間に有意差あり

【0037】また、ICRマウスでは下記の表5に示す 【表5】

結果を得た。

【0038】

	第1群	第2群	第3群
給餌飼料 (水溶性アラビノキラン)	飼料1 (0%)	飼料2 (2.5%)	飼料3 (5%)
<u>腸内細菌数(Log細菌数/g)</u>			
<u><i>Escherichia coli</i></u>	5.4±0.7 ^a	5.0±0.3	4.6±0.3 ^a
<u><i>Streptococcus</i></u>	5.3±1.1 ^d	4.4±0.3 ^d	0 ^d
<u><i>Enterococcus</i></u>	5.4±0.8	5.5±0.8	5.5±0.5
<u><i>Staphylococcus</i></u>	4.2±0.7	3.5±2.1	3.4±1.9
<u><i>Lactobacillus</i></u>	8.0±0.7	8.7±0.5	8.4±0.6
<u><i>Bifidobacterium</i></u>	9.1±0.2 ^{a,d}	9.7±0.5 ^a	10.0±0.2 ^d
<u><i>Bacteroidaceae</i></u>	9.4±0.4	9.5±0.3	9.4±0.2
<u><i>An. G(+)</i> coccus¹⁾</u>	9.5±0.5	9.5±0.3	9.6±0.3
<u>揮発性脂肪酸量(μmol/g)</u>			
酢酸	25.7±1.4 ^d	33.1±7.2 ^c	51.3±8.6 ^{c,d}
プロピオン酸	5.5±1.3 ^c	7.4±2.1	10.1±2.2 ^c
イソ酪酸	0.7±0.1 ^{c,d}	0.4±0.1 ^c	0.3±0.1 ^d
酪酸	4.8±1.0 ^d	7.3±3.4	16.3±5.2 ^d
イソ吉草酸	0.7±0.1 ^{b,d}	0.5±0.2 ^b	0.4±0.1 ^d
吉草酸	0.7±0.1	0.6±0.2	0.8±0.2
合計	38.2±3.3 ^d	49.3±10.9 ^c	78.9±12.5 ^{c,d}
<u>pH</u>	7.7±0.2 ^d	7.5±0.2 ^c	7.1±0.2 ^{c,d}

1) 嫌気性グラム陽性のコッカス(ペプトストレプトコッカス等を含む)

2) 陽性例

a: 0.05, b: 0.02, c: 0.01, d: 0.001レベルで同じ符号間に有意差あり

【0039】表4の結果から、ウイスターラットを用いた実験では、本発明における特定の水溶性アラビノキシランを含有する飼料2および飼料3を給餌した第2群と第3群では、該水溶性アラビノキシランを含まない飼料1と給餌した第1群のラットに比べて、水溶性アラビノキシランの添加量の応じて有用菌であるビフィズス菌が有意に増加し、一方有害菌である大腸菌、ストレプトコッカス菌およびスタフィロコッカス菌は第2群では増加せず変化がなく、第3群では有意に減少していることがわかる。また、表4の結果から、水溶性アラビノキシランの添加量の応じて、酢酸およびプロピオン酸の量が顕著に増加すると共にpHが低下することがわかる。

【0040】更に表5の結果から、ICRマウスを用いた実験においても、ウイスターラットによる実験の場合とほぼ同じ傾向になることがわかる。

【0041】《実施例 3》本発明の水溶性アラビノキ

シランの効果を調べるために、年齢21~23才の健康な成人男性9名からなる被検者に、実施例1で製造した凍結乾燥物を水溶性アラビノキシランとして一人当たり毎日5グラムずつになるように2週間にわたって摂取させた。この間、生菌製剤、市販オリゴ糖、市販食物繊維および乳酸飲料の摂取を制限した他は特に食事制限を行わなかった。摂取直前、摂取1週間後、摂取2週間後および摂取中止1週間後に便を採取して、各排便日における一人当たりの平均排便量(g)および便のpHを測定すると共に、便の水分含量を下記の方法により測定した。

【0042】また、光岡らの方法[(1)Mitsuoka, T., K. Ohno, Y. Benno, K. Suzuki, and K. Nanba. 1976. Die Faekalflora bei Menschen. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Orig. A234: 219-233 および(2)Mitsuoka, T., T. Segal, and S. Yamamoto. 1965. Eine ver

besserte Methodik der qualitativen und quantitativ en Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Orig. A195:455-469] に準拠して便の腸内菌叢、アンモニア濃度および腐敗産物(硫化物、フェノール、クレゾール、エチルフェノール、インドール、スカトール)濃度を下記の方法により調べた。その結果を、下記の表6に示す。

【0043】便の水分含量の測定: 便1gを予め恒量しておいたビーカーに精秤し、10mmHg以下の減圧下に105℃の温度で6時間乾燥して、乾燥後の便重量を測定して、減量分を水分としてその含量(%)を求めた。

【0044】腸内菌叢の測定: 採取した便1gを秤量して直ちに嫌気性希釈液9ミリリットルを入れた試験管に移し、酸素を含まない無菌炭酸ガスを吹き込んでよく混和した後、その1ミリリットルを採取して上記と同じ希釈液9ミリリットルを入れた別の試験管に移して無菌炭酸ガスを吹き込み混和した。同様の操作を繰り返して10⁸倍に希釈した液を調製した。嫌気性菌用平板9種類および好気性菌用平板7種類を準備し、これらの平板の各々に上記で調製した便の希釈液を各0.05ミリリットルずつ一様に塗布した。嫌気性菌用平板は、硫酸銅溶液で還元したスチールウールと共にジャーに入れて雰囲気炭酸ガスで置換して37℃で72時間培養した。また、好気性菌用平板のうちのDHL寒天培地とTS寒天培地は各々37℃で24時間好気培養した。別の好気性菌用平板であるNAC寒天培地は、37℃で48時間培

養した。更に好気性菌用平板であるTATAC培地、PEES培地およびPNAC培地は、37℃で72時間好気培養した。また、好気性菌用平板のLBS寒天培地は、これをジャーに入れてスチールウールを入れずに雰囲気炭酸ガスに置換して37℃で72時間微好気培養した。培養終了後、集落の形成、グラム染色性および細胞の形態によって菌群を決定して集計し、便1g当たりの常用対数で菌数を表した。その際の有意差の検定はpaired-t検定により行った。

【0045】便中のアンモニア濃度の測定: ビーカーに便0.5gを精秤し、これに純水を加えて総量を50ミリリットルに希釈して1N苛性ソーダ溶液でpHを12に調整し総重量を測定した後、隔離型アンモニウムイオン電極を取り付けたイオンメーターでアンモニウムイオンを測定して便1g中のアンモニア量(μg)で表した。

【0046】便中の腐敗産物濃度の測定: ナス型フラスコに便1gを秤量し、これに純水5ミリリットルを加え、pH8~9に調整した後水蒸気蒸留を行った。内部標準としてp-イソプロピルフェノールを加え50ミリリットルに定量した後、これをガスクロマトグラフィーにかけて、各腐敗産物(硫化物、フェノール、クレゾール、エチルフェノール、インドール、スカトール)を分別定量し、便1g当たりの量(μg)で表した。

【0047】

【表6】

	摂取直前	摂 取 1週間後	摂 取 2週間後	摂取停止 1週間後
1日当り排便量(g/1名)	99.4±34.8	107.3±37.5	106.6±21.7	95.3±8.6
便のpH	6.5±0.3	6.3±0.5	6.2±0.3	6.4±0.3
便の水分含量(%)	74.1±2.1	75.1±3.1	76.5±4.2	74.5±2.6
<u>便中菌数(Log函数/g)</u>				
全体の菌数	10.97±0.16	10.88±0.30	10.78±0.32	11.03±0.12
<u>Bifidobacteria</u>	9.98±0.28	10.40±0.30	10.19±0.30	10.03±0.14
<u>Bacteroidaceae</u>	10.67±0.20	10.51±0.33	10.56±0.34	10.84±0.16
<u>Eubacteria</u>	10.00±0.31	9.88±0.22	9.61±0.59	9.98±0.33
<u>Peptococcaceae</u>	9.50±0.62	9.41±0.41	9.29±0.43	9.59±0.24
<u>Megasphaerae</u>	8.75±0.36	8.10±0.66	9.30	9.31±0.18
<u>Curved rods</u>	8.73±0.61	9.00	8.30	8.94±0.58
<u>Veillonellae</u>	6.10±0.20			6.36±1.39
<u>Clostridia Lecithinase(+)</u>	4.68±1.30	4.02±1.46	4.91±1.34	5.13±1.77
<u>Clostridia Lecithinase(-)</u>	8.98±0.49	8.63±0.41	8.92±0.64	9.33±0.35
<u>Lactobacilli</u>	5.48±1.66	6.69±1.44	5.30±1.96	7.17±1.88
<u>Enterobacteriaceae</u>	8.17±0.95	7.56±0.86	7.81±1.03	8.77±1.20
<u>Pseudomonads</u>	3.29±0.68	3.13	2.98±0.48	3.33±0.78
<u>Streptococci</u>	7.87±1.41	8.54±1.09	7.82±1.17	8.39±0.93
<u>Staphylococci</u>	3.36±0.77	3.76±0.55	3.25±0.64	4.40±1.46
<u>Bacilli</u>	3.49±0.92	5.25±1.48	4.35±1.39	4.06±1.59
<u>Yeasts</u>	2.95±1.13	3.05±0.94	3.22±0.57	3.07±0.44
<u>Molds</u>	2.60	2.30	2.30	2.54
<u>便中アンモニア濃度(μg/g)</u>	311.55±132.40	203.05±81.21	192.70±59.14	299.00±129.42
<u>便中腐敗産物濃度(μg/g)</u>				
硫化物	6.91±2.32	4.93±2.16	3.66±2.66	6.74±1.33
フェノール	28.34±12.93	14.43±6.56	14.66±8.45	21.01±9.13
クレゾール	40.02±23.20	33.88±25.26	35.93±25.64	48.48±31.61
エチルフェノール	4.95±6.18	3.00±2.77	2.87±1.80	5.57±5.56
インドール	25.18±13.61	15.71±5.69	14.66±7.83	31.80±18.06
スカトール	9.43±5.32	8.27±8.52	3.02±2.00	17.81±14.61

【0048】上記表6の結果から、本発明の水溶性アラビノキシランを摂取すると、便のpHが低下すると共に腸内有用菌であるビフィズス菌の増殖が促進され、且つバクテロイデス菌などの腸内有害菌の増殖が抑制されることがわかる。また表6の結果は、水溶性アラビノキシランを摂取した場合にはアンモニア、その他の腸内腐敗産物の濃度が減少することを示しており、これはアンモニアやその他の腸内腐敗産物の主たる発生源である腸内有害菌の増殖が抑制されたことを裏付けている。更に、表6の結果は、水溶性アラビノキシランを摂取した場合には、便中の水分含量が適性便の水分含量とされている

80%に近づくと共に、排便量が増加することを示しており、このことから本発明の水溶性アラビノキシランは腸内の状態をビフィズス菌などの有用菌の増殖に有利な状態にし、便秘の解消などにも有効であることが理解できる。

【0049】

【発明の効果】水溶性アラビノキシラン、特にイネ科植物のアラビノキシラン含有部位を水の存在下に温度100～145℃、圧力1～4気圧で加熱処理した後、植物細胞壁崩壊酵素を作用させることにより得られた分子量が1500～7000の水溶性アラビノキシランを有効

成分とする本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、ヒトや動物の腸内細菌のうち、有用菌であるビフィズス菌および乳酸菌によって選択的に資化され大腸菌等の腐敗菌や他の有害菌によっては資化されないで、有害菌の増殖を招かずに、有用菌であるビフィズス菌や乳酸菌を選択的に増殖させることができ、ヒトや動物の健康を増進させ*

* ることができる。特に、本発明の腸内有用菌増殖促進剤は、成人の腸内におけるビフィズス菌の大半を占めるビフィドバクテリウム アドレセンス (B. adolescentis) およびビフィドバクテリウム ロングム (B. longum) の増殖促進効果大きい。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:01)

THIS PAGE BLANK (USPTO)